

UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS
DER ALPHA-AMYLASE AN SPEICHEL-
SPUREN MITTELS TESTSTREIFEN

Peter Hirth

*Dess
München
1906*

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Spann

UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS DER ALPHA-AMYLASE AN SPEICHEL-
SPUREN MITTELS TESTSTREIFEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

PETER HIRTH

aus

Landshut

Jahr

1983

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Tröger
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Spann
Dekan: Prof. Dr. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 13. 2. 1986

A b s t r a c t

HIRTH, PETER

UNTERSUCHUNGEN ZUM NACHWEIS DER ALPHA-AMYLASE AN SPEICHEL- SPUREN MITTELS TESTSTREIFEN

Ziel der Untersuchungen war, die Nachweisbarkeit von Speichelspuren in Geweben mittels Amylase-Teststreifen festzustellen. Das Verfahren sollte möglichst spezifisch, einfach und zeitsparend sein; die Speichel-Amylase, deren physiologische Konzentration ca. 6000 - 9000 Wohlgemuth-Einheiten ($\approx 1,2 - 1,8 \times 10^6$ iU) beträgt, sollte sich über einen möglichst langen Zeitraum nachweisen lassen.

Es wurden von drei Probanden jeweils zwei Speichelpuben auf Leinentuch aufgetragen und getrocknet. Diese Proben wurden im Verlauf der folgenden Wochen und Monate auf ihre Alpha-Amylase-Aktivität überprüft. Die Maße der Probestücke betrugen 5 X 5 mm, die Verdünnung der Proben in physiologischer Kochsalzlösung schwankte zwischen 5 und 25 Tropfen, die Extraktionszeit lag zwischen 10 und 60 Minuten. Des weiteren wurden Leinentuchstücke mit Speichel von 10 unterschiedlichen Probanden hergestellt, um individuelle Unterschiede der Speichel-Amylase-Aktivität mittels Teststreifen zu erfassen. Abschließend wurde das Teststreifen-Verfahren mit dem Alpha-Amylase-Nachweis nach RADAM verglichen. Es zeigte sich, daß die Speichelnachweisbarkeit innerhalb eines Zeitraums von ca. 4 - 10 Wochen gewährleistet ist. Signifikante Unterschiede wurden sowohl von Proband zu Proband als auch von Probe zu Probe des einzelnen Probanden festgestellt. Der Vergleich der Speichel-Amylase-Aktivitäten an Proben von 10 unterschiedlichen Personen ergab einen Schwankungsbereich von ca. 3 Farbstufen (von insgesamt 5). Die abschließende Gegenüberstellung des Teststreifenverfahrens und des Verfahrens nach RADAM ergab, daß das Test-

streifenverfahren spezifischer ist, da es nicht auf die Alpha-Amylase in Harn, Sperma und Nasensekret reagiert. Mit der Methode nach RADAM lassen sich dagegen Alpha-Amylase-Aktivitäten über einen Zeitraum von über 4 Monaten feststellen verglichen mit ca. 4 - 10 Wochen beim Teststreifenverfahren.

I N H A L T

A Einleitung

Rückblick auf die Entwicklung von Speichelnachweisverfahren basierend auf dem Nachweis der Alpha-Amylase-Aktivität im Speichel

- Prinzip des Rapignost "Amylase" Teststreifenverfahrens und der Methode nach RADAM

B Eigene Versuche

C Untersuchungsergebnisse

D Diskussion

E Zusammenfassung

F Literaturverzeichnis

A Einleitung

Der Nachweis von Speichelspuren in Geweben und an anderen Spurenträgern gründet sich auf das stärke-spaltende Enzym des Speichels, die Alpha-Amylase.

Entdeckt wurde die Alpha-Amylase des Speichels 1831 von LEUCHS.

1845 folgte die Entdeckung der Alpha-Amylase im Pankreassaft durch BOUCHARDAT und SANDRAS. Im Jahr 1846 gelang es MAGENDIE die Alpha-Amylase im Blut nachzuweisen. COHNHEIM schließlich stellte 1863 die Alpha-Amylase-Aktivität im Urin fest. Wie man heute weiß, beträgt die physiologische Alpha-Amylase-Konzentration des Speichels ca. 6000 bis 9000 Wohlgemuth-Einheiten ($\approx 1,2 - 1,8 \times 10^6$ iU), während die Amylase-Konzentration in den übrigen Körperflüssigkeiten in der Regel unter 130 Wohlgemuth-Einheiten (≈ 26.000 iU) liegt.

Die oben erwähnten Entdeckungen wurden mit Hilfe saccharogener Aktivitätsbestimmungen gemacht. Es waren Zwei-Punkt-Bestimmungen, bei der die durch Substrathydrolyse entstandenen Zucker gemessen wurden. 1908 wurde von WOHLGEMUTH das sog. amyloklastische Verfahren zum Nachweis der Alpha-Amylase eingeführt. Hierbei wurde der Verlust der Jodreaktion, der durch den Abbau der Stärke hervorgerufen wurde, gemessen. Beide Verfahren werden im Prinzip heute noch verwendet, obgleich sie in der Praxis relativ zeitaufwendig sind.

Die erste Methode zum Nachweis angetrockneten Speichels in Geweben wurde 1928 von MUELLER (9) vorgestellt. Sie basiert auf dem oben beschriebenen amyloklastischen Verfahren nach WOHLGEMUTH und zählt nach wie vor zu den besten Amylase-Nachweisverfahren.

Die wichtigsten Schritte: Nach der Vernichtung der Bakterien durch Toluol werden Stärke-, Kochsalzlösung und Phosphatpuffer dazugegeben. Es folgt eine 8 stündige Inkubation im Brutschrank, worauf mit Hilfe von LUGOL'scher Lösung der Alpha-Amylase-Nachweis durchgeführt werden kann.

Das positive Ergebnis äußert sich in einem Ausbleiben der zu erwartenden Blauverfärbung. Ein von der MUELLER'schen Methode abgeleitetes Verfahren ist das nach RADAM (1965, 12). Die wesentlichen Unterschiede bestehen in der Extraktion mit 0,25 m Natriumacetat und einer 30-minütigen Inkubation mit Acetat-Stärke-Lösung bei 37°C.

Ebenfalls bekannt ist der Nachweis nach SCHAIDT (1956, 13). Ihm liegt die Stärkespaltung durch die Alpha-Amylase mit Messung der zunehmenden reduzierenden Zucker zugrunde. Die Vorzüge der Methode bestehen darin, daß auch kleinste Speichelmengen nachgewiesen werden können und daß die ungefähre Speichelmenge abgeschätzt werden kann.

Auf demselben Prinzip beruht das Verfahren nach YOSHIDA (1960, 18). Der Nachweis erfolgt mit Triphenyl-Tetrazoliumchlorid (TTC), welches reduziert wird zu unlöslichem, rotem Triphenylformazan.

THOMA (1961, 14) wandelte das Verfahren ab, da es bei Speichel auf Verschußblaschen und Briefmarken zu ungenauen Ergebnissen führte. Gleichzeitig stellte er fest, daß bei Briefmarken, Klebelaschen und Zigarettenmundstücken, die mit Speichel in Berührung gekommen waren, auch ohne den Zusatz von Stärke eine reduzierende Wirkung auf TTC zustande kommt. Er zog daraus die umstrittene Schlußfolgerung, daß dafür nicht die Alpha-Amylase des Speichels, sondern eine andere im Speichel vorhandene Substanz verantwortlich war, die direkt eine reduzierende Wirkung auf das TTC ausübte. THOMA (14) dachte dabei im Besonderen an das

Vitamin C, die Ascorbinsäure. RADAM (1965, 12) hielt dem entgegen, daß die Reduktion von TTC durch die Speichelamylase und das in Klebemitteln enthaltene Dextrin hervorgerufen würde. Seine Begründung: Der Vitamin C Gehalt des Speichels ist zwar sehr hoch (GLAVIND 1948, 4), jedoch gehört Ascorbinsäure zu den leicht zersetzlichen Vitaminen (GSTIRNER 1951, 5), so daß sie in der Spurenanalyse eine eher untergeordnete Rolle spielt. Außerdem wird das vorhandene Vitamin C während der einzelnen Arbeitsschritte so stark verdünnt, daß es zu keiner signifikanten Reduktion von TTC mehr kommen kann. Und drittens sind im Speichel noch andere Substanzen vorhanden, die ebenfalls eine reduzierende Wirkung ausüben können - z.B. Glucose (BECKER und KESTERMANN, 1936, 1 / BLATT, KERN und CORTUEM, 1945, 2). Von HAAS (1968, 6) angestellte Untersuchungen konnten indes die Einwände von RADAM (12) nicht bestätigen.

Ein modernes Verfahren zum Nachweis der Speichel-Amylase ist die Methode nach WILLOTT und GRIFFITHS (1980, 17). Die Durchführung ist einfach und es lassen sich damit auch großflächige Untersuchungen zum Aufspüren schwer erkennbarer Speichelflecken anstellen. Auf das zu prüfende Gewebe wird Filterpapier gelegt, welches wiederum dicht mit Partikeln aus blauer Stärke bedeckt wird. Sofern Alpha-Amylase und damit Speichel vorhanden ist, wird die Stärke gespalten und es entstehen hellblaue Flecken, die mit den Speichelflecken identisch sind. Das eben beschriebene Verfahren vereint die Vorteile des Verfahrens nach WILLOTT (1974, 16) mit dem von WHITEHEAD und KIPPS (1975, 7). Durch die Verwendung eines an Stärke gebundenen Farbstoffs werden falsch positive Reaktionen (siehe Verfahren nach THOMA, 14) weitgehend vermieden, da nur dann Farbstoff freigesetzt werden kann, wenn Stärke durch Amylase gespalten wird. Ein weiterer Vorteil der Methode besteht darin, daß durch Messung der Farbdichte auf die Höhe der Alpha-Amylase-Aktivität geschlossen werden kann.

Wie NELSON und KIRK (1963, 10) feststellten, kann man sich zum Nachweis von Speichel im Prinzip folgender "marker" bedienen:

- a) Enzyme wie Alpha-Amylase, alkalische Phosphatase oder Lysozym
- b) Proteine ohne Enzymfunktion wie z.B. Mucoproteine
- c) abgeschilferte Epithelzellen
- d) Anorganische Stoffe wie Nitrit oder Thiocyanat

Unter allen Markern ist aber die Alpha-Amylase der praktikabelste und am sichersten nachweisbare, was unter anderen auch von NICKOLLS (1956, 11) erkannt wurde, dessen Verfahren zum Speichelnachweis ebenfalls auf der Bestimmung der Alpha-Amylase beruht. Mögliche Unsicherheitsfaktoren beim Amylase-Nachweis sind die starken Schwankungen des Amylase-Gehalts im Speichel, die von DAWES (1972, 3) sowie KIPPS und WHITEHEAD (1975, 7) festgestellt wurden. Darüber hinaus können auch Kontaminationen von Gewebeprobestücken mit Protein aus Blut oder Sperma zu falsch positiven Ergebnissen führen, wie WILDING (1965, 15) und LATHIA / BRENDEBACH (1978, 8) erkannten. Dennoch ist im Vergleich zu anderen Speichelnachweismethoden wie dem Rhodankaliumnachweis oder der UV - Fluoreszenz der Speichelnachweis durch Amylasebestimmung bis heute am sichersten.

Das Prinzip der beiden angewendeten Nachweisverfahren läßt sich folgendermaßen beschreiben:

- Rapignost "Amylase" Teststreifenverfahren

Der Teststreifen, der aus einem Plastikstreifen, einer Vlieszone (Auftragszone) und einer Papierzone (Nachweiszone, die mit einem chromogenen Stärkesubstrat versehen ist) besteht, wird für ca. 3 - 5 Sekunden mit der Vlieszone in die zu prüfende Flüssigkeit gehalten. In den darauffolgenden 2 - 3 Minuten diffundiert die aufgenommene Flüssigkeit durch die Nachweiszone. Enthält die Flüssigkeit Alpha-Amylase, so wird das chromogene Substrat durch das Enzym gespalten und der freigewordene Farbstoff chromatographiert in den weißen Bereich der Nachweiszone. Die Intensität der Verfärbung, die von einem hellen rosa bis zu einem dunklen violett reichen kann, ist ein Maß für die Amylaseaktivität in der Flüssigkeit.

- Verfahren zum Nachweis von Alpha-Amylase nach RADAM (12)

Hierbei handelt es sich um ein modifiziertes Verfahren von MUELLER (1928, 9), welches wiederum auf der Amylasebestimmung nach WOHLGEMUTH basiert. Die Vorteile des Verfahrens nach RADAM (12) gegenüber dem Verfahren nach MUELLER (9) bestehen darin, daß es empfindlicher ist und zudem weniger Zeit beansprucht.

Bei dem Verfahren nach RADAM (12) wird zunächst ein ca. 1 cm^2 großes Stück eines Spurenträgers (z.B. Stoff) eine Stunde lang in 1 ml 0,25 m Natriumacetat extrahiert. Zu diesem Extrakt wird 1 ml einer Acetat-Stärke-Lösung gegeben und der Ansatz für ca. 30 Min. in ein Wasserbad (37°C) gestellt. Enthält der Ansatz Alpha-Amylase, so werden die

Alpha-1,4 glucosidischen Bindungen der Stärke durch das Enzym gespalten und es entstehen höhermolekulare Polysaccharidbruchstücke (Dextrine), die weiter abgebaut werden zu Maltose bzw. Isomaltose. Der Nachweis der angegebenen Reaktion erfolgt durch Zugabe eines Tropfens verdünnter LUGOL'scher Lösung: Es tritt keine blaue Verfärbung ein, da keine Stärke mehr vorhanden ist und deshalb das in der LUGOL'schen Lösung vorhandene Jod nicht mehr damit reagieren kann. Bei einer zur Kontrolle mitgeführten Leerprobe hingegen zeigt sich erwartungsgemäß eine Blauverfärbung.

B Eigene Versuche

Es gibt eine ganze Reihe von Nachweisverfahren für Speichelspuren in Stoffen, die direkt oder indirekt auf der Bestimmung der Alpha-Amylase im Speichel basieren. Der Nachteil dieser Verfahren besteht darin, daß sie einen nicht geringen Aufwand an Material und Zeit erfordern. Außerdem sind diese Verfahren relativ unspezifisch, da sie wie z.B. das Verfahren nach RADAM (12) auch auf Alpha-Amylase-Spuren in Harn, Sperma und Nasensekret ansprechen. Ziel der Versuche sollte es deshalb sein, eine möglichst einfache und zeitsparende Methode zum Nachweis von Speichelspuren in Geweben zu finden, die zudem möglichst spezifisch sein sollte.

Verwendet wurden dazu die Rapignost "Amylase" Teststreifen, die von den Behringwerken, Marburg, zum Nachweis der Alpha-Amylase in frischem Harn hergestellt werden. Da die Farbintensitäten, die auf der Verpackung der Teststreifen angegeben sind, einen normalen (negativ), einen leicht erhöhten (+) bzw. einen stark erhöhten (++) Alpha-Amylase-Spiegel im Harn angeben konnte diese Farbabstufung zum Nachweis der Speichel-Amylase in Stoffen nicht übernommen werden. Stattdessen wurden fünf Farbabstufungen unterschieden:

- Ø = keinerlei Verfärbung der Nachweiszone feststellbar
- (+) = leichte Farbspuren (rosa) in der Nachweiszone erkennbar
- + = rosa Verfärbung der gesamten Nachweiszone (entspricht der auf der Verpackung angegebenen Bezeichnung "negativ" für die Anwendung bei Urin)
- II = violett-rosa Verfärbung der gesamten Nachweiszone (entspricht der Bezeichnung + auf der Verpackung)
- III = dunkel-violette Verfärbung der gesamten Nachweiszone (entspricht der Bezeichnung ++ auf der Verpackung)

Zur Herstellung der zu untersuchenden Spureenträger wurde von Verwandten und Bekannten über einen Zeitraum von jeweils ca. 1/2 - 1 Stunde Speichel gesammelt und dieser dann über ein Stück weißen Leinentuchs ausgebreitet und bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet.

Zunächst galt es festzustellen, wie spezifisch das Teststreifenverfahren ist. Dazu wurden mit Speichel, Urin, Sperma und Nasensekret versehene Leinentuchstücke verwendet. Diese wurden quadratisch auf eine Kantenlänge von ca. 5 mm zugeschnitten und in physiologischer Kochsalzlösung extrahiert.

Die Verdünnung betrug 5 - 25 Tropfen Kochsalzlösung, die Extraktionsdauer 10 Minuten bis 8 Stunden.

Es zeigte sich, daß die mit Urin, Sperma und Nasensekret versehenen Tuchstücke selbst bei geringster Verdünnung (5 Tropfen) und bei längster Extraktionsdauer (8 Stunden) keinerlei Verfärbung der Teststreifen hervorriefen. Im Gegensatz dazu konnte bei den mit Speichel getränkten Stücken bei einer Verdünnung von 15 Tropfen und einer Extraktionsdauer von ca. 20 Minuten bereits eine Verfärbung entsprechend (+) (rosa Farbspuren in der Nachweiszone) festgestellt werden, womit das Teststreifenverfahren als ausreichend spezifisch für Speichel bezeichnet werden kann.

Als Zweites war herauszufinden, in welchen Verdünnungen sich der auf den Tuchstücken befindliche Speichel mit Hilfe der Teststreifen nachweisen läßt. Die maximale Verdünnung, so stellte sich heraus, liegt bei 20 - 25 Tropfen, die minimale Verdünnung beträgt ca. 5 Tropfen.

Was die erforderliche Extraktionszeit betrifft, so wurde festgestellt, daß sie mindestens 10 Minuten betragen muß.

Aber auch dann zeigt sich nur bei geringster Verdünnung (5 Tropfen) eine sichtbare Verfärbung in der Nachweiszone des Teststreifens.

Die maximale, noch sinnvolle Extraktionszeit beträgt ca. 60 Min.; eine weitere Erhöhung der Extraktionsdauer erbringt keine nennenswerte Erhöhung der Farbintensität in der Nachweiszone.

Nachdem die günstigsten Bedingungen zum Nachweis der Speichel-Amylase festgestellt worden waren, sollte geprüft werden, wie lange sich die Alpha-Amylase in den Leinentuchstücken nachweisen läßt. Dazu wurde zunächst im Abstand von 2 - 3 Tagen, später im Abstand von ca. 1 Woche bei den einzelnen Probestücken die Farbreaktion bei unterschiedlicher Verdünnung (5 - 25 Tropfen aus der Pipette) und bei variierender Extraktionszeit (20, 40 und 60 Minuten) gemessen.

Als erstes wurden Leinentuchstücke mit Speichel von 3 unterschiedlichen Probanden in der angegebenen Weise untersucht. Etwa 4 Wochen später wurden von denselben Probanden nochmals Speichelproben hergestellt und ebenfalls in den darauffolgenden Wochen auf ihre Farbreaktion überprüft. Damit sollte getestet werden, ob es bei einem Probanden größere Unterschiede der Alpha-Amylase-Aktivität im Speichel gibt, verursacht durch vorangegangene Stimuli wie z.B. Essen und Trinken oder durch andere Einflüsse.

Um die unterschiedliche Alpha-Amylase-Aktivität verschiedener Personen abschätzen zu können, wurden Tuchstücke mit Speichel von 10 Testpersonen hergestellt und einmal mittels Teststreifen auf ihre Aktivität untersucht.

Zum Schluß sollte das Rapignost "Amylase" Teststreifenverfahren mit einer bekannten Methode, nämlich dem Alpha-Amylase-Nachweis nach RADAM (12) verglichen werden. Es wur-

den alle vorhandenen Leinentuchstücke mit Speichel, Urin, Sperma und Nasensekret zuerst mit der Methode nach RADAM (12) und danach mit dem Teststreifenverfahren überprüft. Bei beiden Verfahren wurden quadratische Stoffstücke mit einer Kantenlänge von 5 mm verwendet, beim Teststreifenverfahren wurde mit 5 Tropfen über einen Zeitraum von 40 Minuten extrahiert.

C Untersuchungsergebnisse

Speichel: Proband I / Probe Nr. 1 (Leinentuchstücke
5 X 5 mm)

- Extraktionszeit: 20 Minuten

Verdün-
nung

(Tropfen)	25	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	20	Ø	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	15	(+)	(+)	Ø	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	10	+	+	(+)	+	(+)	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	5	+	+	+	(+)	(+)	+	(+)	(+)	(+)	Ø	Ø
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Alter (Wochen)

- Extraktionszeit: 40 Minuten

Verdün-
nung

(Tropfen)	25	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	20	Ø	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	15	+	II	Ø	+	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	10	+	II	(+)	+	+	(+)	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø
	5	II	III	II	II	+	(+)	+	(+)	(+)	Ø	Ø
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Alter (Wochen)

- Extraktionszeit: 60 Minuten

Verdün-
nung

(Tropfen)	25	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	20	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	15	+	II	(+)	(+)	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	10	+	III	(+)	+	+	+	(+)	+	(+)	(+)	Ø
	5	II	III	II	II	II	+	+	+	(+)	(+)	Ø - (+)
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Alter (Wochen)

Speichel: Proband I / Probe Nr. 2 (Leinentuchstücke
5 X 5 mm)

- Extraktionsdauer: 20 Minuten

Verdün-
nung

(Tropfen)	25	20	15	10	5
	Ø	+	+	II	III
	Ø	Ø	(+)	+	II
	Ø	(+)	Ø	+	II
	Ø	Ø	(+)	(+)	II
	Ø	Ø	Ø	(+)	+
	Ø	Ø	Ø	Ø	+
	Ø	Ø	Ø	Ø	+
	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	0	1	2	3	4
	5	6	7	8	9
	10				

Alter (Wochen)

- Extraktionsdauer: 40 Minuten

Verdünnung

(Tropfen)	25	20	15	10	5	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	+ - II	(+)	Ø	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	II	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
	III	II	II	II	+	II	+	(+)	Ø	(+)	Ø					
	III	II	III	II	III	II	II	II	+	(+)	(+)					

- Extraktionsdauer: 60 Minuten

Verdünnung

(Tropfen)	25	(+)	(+)	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
20	+	(+)	(+)	+	(+)	+	(+)	∅	∅	∅	∅
15	+	+	II	II	(+)	+	+	(+)	∅	∅	∅
10	III	II	+	II	+	II	+	II	+	∅	∅
5	III	III	III	II	II	II	II	II	+	+	(+)
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Alter (Wochen)										

1.) Rapignost "Amylase" Teststreifenverfahren

- Farbreaktionen bei frischen Speichelp Proben von 10 verschiedenen Personen
 (maximales Alter der Speichelp Proben: ca. 8 Tage)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
iii	ii	ii	iii	iii	iii	ii	+	ii	ii

(Maße der Leientuchstücke: 5 X 5 mm; Verdünnung: 5 Tropfen NaCl-physiologische;
 Extraktionsdauer: 40 Minuten)

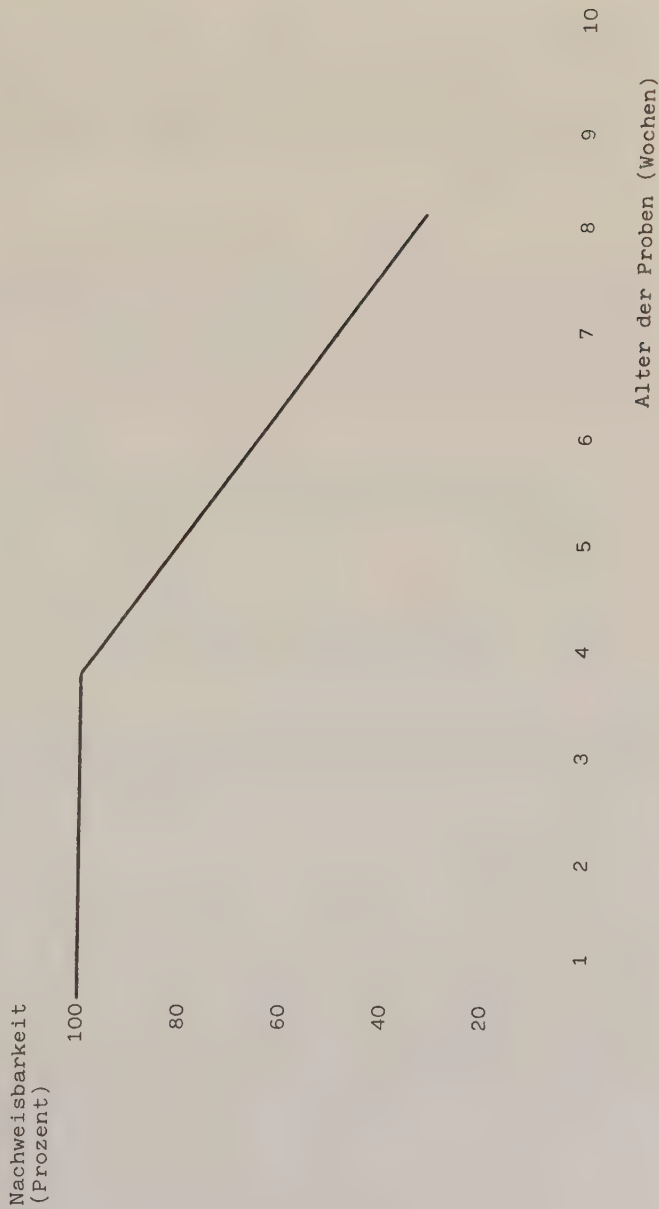
2.) Vergleich des Rapiagnost "Amylase" Teststreifenverfahrens mit dem Alpha-Amylase-Nachweis nach RADAM (12)

Probe	I/1	I/2	II/1	II/2	III/1	III/2	1	2	3	4
<u>Teststreifen:</u>	∅	+	∅	∅	∅	∅	+++	++	++	+++
<u>RADAM:</u>	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
Probe	5	6	7	8	9	10	Harn	Sperma	Nasensekret	
<u>Teststreifen:</u>	+++	+++	++	+	++	++	∅	∅	∅	
<u>RADAM:</u>	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	

Das Alter der Probestücke I/1, I/2, II/1, II/2, III/1, III/2 betrug max. ca. 4 Monate, das der Probestücke 1 - 10 maximal ca. 8 Tage
 (Teststreifen: Maße der Probestücke 5 X 5 mm; Verdünnung 5 Tropfen; Extraktionszeit 45 Minuten)
 (RADAM, 12: Maße der Probestücke 1 X 1 cm)

3.) Graphische Darstellung der maximalen Nachweisbarkeitsdauer der Proben I/1, I/2, II/1, II/2, III/1 und III/2

(Leinentuchstücke 5 X 5 mm; Verdünnung 5 Tropfen $\hat{=}$ geringste Verdünnung; Extraktionszeit 40 Minuten)



D Diskussion

Aus den Untersuchungsergebnissen Seite 16 - 18 geht hervor, daß sich die Alpha-Amylase-Aktivität bei Proband I / Probe 1 ca. 9 - 10 Wochen lang nachweisen läßt (bei 60 Minuten Extraktionsdauer).

Für Proband I / Probe 2 lag der Wert ebenfalls bei über 9 Wochen ("Nachweisen" bedeutet, daß der Teststreifen in der bereits erwähnten Farbabstufung mindestens mit (+) reagiert, d.h. daß zumindest rosa Farbspuren in der Nachweiszone des Teststreifens erscheinen).

Bei Proband II / Probe 1 konnte über ca. 7 Wochen eine Alpha-Amylase-Aktivität nachgewiesen werden. Für Probe 2 desselben Probanden lag die Nachweisbarkeitsgrenze bei ca. 5 Wochen.

Bei Proband III / Probe 1 bzw. 2 konnte ca. 5 bzw. 4 Wochen lang eine Alpha-Amylase-Aktivität gemessen werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Nachweisbarkeit für Alpha-Amylase mittels Teststreifenverfahren sowohl von Proband zu Proband als auch von Probe zu Probe des einzelnen Probanden großen Schwankungen unterliegt (zwischen 4 und 10 Wochen).

Die unterschiedliche Extraktionszeit in physiologischer Kochsalzlösung, die bei Proband I 20, 40 und 60 Minuten betrug, wirkte sich auf das Ergebnis kaum aus; lediglich bei 60 Minuten Extraktionsdauer zeigte sich ca. 10 Wochen lang eine Farbreaktion gegenüber den 8 Wochen bei einer Extraktionsdauer von 20 bzw. 40 Minuten. Auffällig auf Seite 16 ist auch die Tatsache, daß bei Proband I / Probe 1 die nach 1 Woche gemessenen Farbintensitätswerte zum Teil höher liegen als die Werte zu Beginn der Meßreihe (Zeit-

punkt 0 auf der Zeitskala). Besonders deutlich wird dies bei den Extraktionszeiten von 40 bzw. 60 Minuten. Zu Beginn der Meßreihe (Zeitpunkt 0) beträgt die maximale Intensität $\overline{II}$ bei einer Verdünnung von 5 Tropfen physiologischer NaCl.

In der 1. Woche nimmt die gemessene Farbintensität noch auf $\overline{III}$ zu, um erst in den darauffolgenden Wochen erwartungsgemäß abzufallen. Ähnliches zeigt sich bei Proband I / Probe 2, wo bei einer Extraktionszeit von 40 Minuten und einer Verdünnung von 5 Tropfen der Farbintensitätswert in der 2. Woche zunächst zu- und dann erst beständig abnimmt.

Eine mögliche Ursache für dieses Verhalten ist die dem Teststreifenverfahren eigene Ungenauigkeit verglichen mit biochemischen Nachweismethoden: trotz grober Farbabstufung läßt sich oft die gemessene Intensität nicht eindeutig der einen oder anderen Farbstufe zuordnen. Denkbar wäre auch, daß die Raumtemperatur während des Meßvorgangs eine Rolle spielt.

In der Durchführungsanleitung ist dazu vermerkt, daß die Temperatur des Probematerials zwischen 20 und 25° C liegen muß.

Weitere mögliche Ursachen für stärker differierende Ergebnisse sind die unterschiedliche Aufnahme bzw. Verteilung des Speichels im Leinentuch sowie Ungenauigkeiten in der Durchführung des Verfahrens. Bezüglich des letztgenannten Punktes ist anzumerken, daß besonders die von der Vlieszone des Teststreifens aufgenommene Flüssigkeitsmenge schwer zu dosieren ist, so daß die Verwendung einer Mikroliterpipette von 100 l Inhalt, wie sie in der Durchführungsanleitung empfohlen wird, ratsam ist.

Auf Seite 19 läßt sich erkennen, wie individuell verschie-

den die Farbreaktionen des Teststreifens bei unterschiedlichen Personen ausfallen können. Das Farbspektrum reicht von rosa (entspricht in der bereits beschriebenen Farbabstufung der Stufe +) bis zu dunkel-violett (entspricht der Farbstufe III). Dabei ist zu berücksichtigen, daß das maximale Alter dieser Proben bei ca. 8 Tagen lag und die Farbreaktion bei älteren Proben entsprechend schwächer ausgefallen wäre. Die unterschiedlichen Reaktionen lassen sich neben der Ungenauigkeit des Teststreifenverfahrens und den während der Durchführung der Messungen auftretenden Abweichungen auch durch individuelle Faktoren erklären. Dabei wäre an eine genetisch bedingte niedrigere oder höhere Alpha-Amylase-Konzentration im Speichel, an Tagesschwankungen bezüglich der Speichelsekretion sowie an vorangegangene Stimuli wie z.B. Essen und Trinken zu denken.

Auf Seite 21 wird das Alpha-Amylase-Teststreifenverfahren mit dem Alpha-Amylase-Nachweis nach RADAM (12) verglichen. Bei den Probanden I, II und III mit der jeweiligen ersten und zweiten Probe zeigen sich bei Verwendung von Teststreifen fast ausnahmslos negative Ergebnisse während das RADAM'sche Verfahren durchweg positive Ergebnisse erbringt. Da die Proben ca. 3 - 4 Monate alt sind läßt sich daraus schließen, daß das Verfahren nach RADAM (12) erheblich empfindlicher als das Teststreifenverfahren ist und deshalb auch nach längerer Zeit auf sehr geringe Alpha-Amylase-Konzentrationen anspricht.

Bei den Proben 1 - 10, die maximal ca. 8 Tage alt sind, reagieren erwartungsgemäß alle Proben sowohl mit Teststreifen als auch mit dem Verfahren nach RADAM (12) positiv.

Ein bemerkenswerter Unterschied ergibt sich noch beim Vergleich beider Methoden an Proben von Harn, Sperma und Nasensekret:

die Teststreifen reagieren bei allen Proben negativ während bei der Methode nach RADAM (12) jedesmal ein positives Ergebnis zu beobachten ist. Das Teststreifenverfahren ist also spezifisch für die Alpha-Amylase des Speichels während das Verfahren nach RADAM (12) unspezifisch reagiert.

E Zusammenfassung

Die Rapiagnost "Amylase" Teststreifen, die zur Messung der Alpha-Amylase-Konzentration im Urin hergestellt werden, lassen sich ohne weiteres auch zum Nachweis von Speichelspuren in Geweben benutzen. Der Hauptvorteil des Teststreifenverfahrens besteht darin, daß die Durchführung sehr einfach und vor allem zeitsparend ist. Das Zuschneiden von Gewebestücken mit den erforderlichen Abmessungen, das Bereitstellen von Reagenzgläsern mit den entsprechenden Verdünnungen an physiologischer Kochsalzlösung sowie das Ablesen der Teststreifen erfordern ein Minimum an Zeitaufwand. Ins Gewicht fällt lediglich die relativ lange Extraktionsdauer von mindestens 10 bis maximal 60 Minuten. Eine Voraussetzung zur Anwendung des Teststreifenverfahrens ist, daß der Speichel in den Gewebeprobestücken nicht zu alt ist. Aus den beschriebenen Versuchen geht hervor, daß das Alter der Proben möglichst nicht über 4 Wochen liegen sollte. In diesem Punkt ist das Teststreifenverfahren anderen Methoden, z.B. der nach RADAM (12) eindeutig unterlegen, da diese noch nach mehreren Monaten einen eindeutigen Nachweis der Alpha-Amylase des Speichels erlauben. Hierbei ist aber zu berücksichtigen, daß das Teststreifenverfahren unter den genannten Meßbedingungen spezifisch ist für die Alpha-Amylase des Speichels.

Andere Verfahren, wie das nach RADAM (12) können auch mit der Alpha-Amylase von Harn, Sperma oder Nasensekret positiv reagieren, so daß die Anwendung weiterer Verfahren zum sicheren Nachweis der Speichel-Amylase erforderlich ist.

Zusammenfassend kann man sagen, daß das Teststreifenverfahren bezüglich der Spezifität, der Einfachheit und des Zeitaufwandes anderen Methoden vorzuziehen ist, unter der Bedingung, daß die Proben ein Alter von ca. 4 Wochen nach Möglichkeit nicht überschreiten.

F Literaturverzeichnis

- (1) Becker, H., E. Kestermann: Dtsch. Arch. klin. Med. 179, 232 (1936)
- (2) Blatt, M.L., M. Kern, C.M. Cortuem: Quantitative study of saliva glucose, J. Pediatr. 27, 71 (1945)
- (3) Dawes, C., Circadian rythms in human salivary flow rate and composition, J. Physiol. (London), 220 (1972) 529 - 545
- (4) Glavind, J., H. Granados, L.A. Hansen, K. Schilling, J. Kruse, H. Dam: Presence of vitamins in saliva. Internat. Zschr. Vitaminforschung 20, 234 (1948)
- (5) Gstirner, F.: Chemisch-physikalische Vitaminbestimmungsmethoden für das chemische, physiologische und klinische Laboratorium. Enke Verlag Stuttgart, 4. Aufl. (1951)
- (6) Haas, W.: Kritisch experimentelle Untersuchungen zum Nachweis von Speichel und Nasensekret und von Epidermisschleimhaut und Organzellen an Spurenrägern. Diss. Marburg 1968
- (7) A.E. Kipps and P.H. Whitehead, The significance of amylase in forensic investigations of body fluids. Forensic Sci. 6 (1975) 137 - 144
- (8) D. Lathia and M. Brendebach, Influence of thiocyanat ions on starch-iodine reaction used for the examination of -amylase-activity. Clin. Chim. Acta, 82 (1978) 209 - 214
- (9) Mueller, B.: Über den Nachweis eingetrockneten Speichels in Tüchern. Dtsch. Zschr. gerichtl. Med. 11, 211 (1928)
- (10) Nelson, D.F. and Kirk P.L. (1963) The identification of saliva. J. Forensic Med. 10, 14 - 21

- (11) Nickolls L.C. (1956) The Scientific Investigation of Crime, London, Butterworth, p. 200
- (12) Radam, G.: Beitr. gerichtl. Med. 23, 226 (1965)
- (13) Schaidt, G.: Arch. Kriminol. 118, 149 (1956)
- (14) Thoma, K.: Arch. Kriminol. 128, 38 (1961)
- (15) P. Wilding, The electrophoretic nature of human amylase and the effect of protein on starch-iodine reaction. Clin. Chim. Acta, 12 (1965) 97 - 104
- (16) G. M. Willott, An improved test for the detection of salivary amylase in stains. J. Forensic Sci. Soc., 14 (1974) 341 - 344
- (17) G.M. Willott and M. Griffiths, A new method for locating saliva stains - spotty paper for spotting spit. Forensic Sci. Int., 15 (1980) 79 - 83
- (18) Yoshida: Nagasaki igakkai zasshi 35, 30 (1960)

HIRTH PETER
LEBENS LAUF

14.4.1959	in Landshut geboren Eltern: Ludwig Hirth, Privatdozent Irmgard Hirth, Hausfrau
1965 - 1969	Volksschule Schäftlarn
1969 - 1970	Gymnasium Icking
1970 - 1978	Theodor-Heuss-Gymnasium Pinneberg Abschluß: Abitur
1978 / 1979	Freiwilliges soziales Jahr
SS 79 - SS 82	Studium der Medizin an der Universität Hamburg Physikum: WS 80/81
WS 82/83 - SS 85	Studium der Medizin an der Ludwig-Maxi- milians-Universität München
11. 12. 1985	Ärztliche Prüfung
27. 12. 1985	Approbation als Arzt

